



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08188540 A**(43) Date of publication of application: **23 . 07 . 96**

(51) Int. Cl

A61K 39/00
A61K 39/00
A61K 39/385
A61K 49/00
C07K 14/47
C07K 16/28
C07K 19/00
G01N 33/564
// A61M 1/36
C12N 15/09
C12P 21/02
(C12P 21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number: **07165632**(22) Date of filing: **30 . 06 . 95**(30) Priority: **30 . 06 . 94 JP 06173291**(71) Applicant: **NISHIKAWA TAKEJI**

(72) Inventor: **AMAYA MASAYUKI**
HASHIMOTO TAKASHI
SHIMIZU NOBUYOSHI
NISHIKAWA TAKEJI
URAGAMI KENICHI

(54) **FUSED PROTEIN RECOGNIZED WITH
 AUTOANTIBODY OF PEMPHIGUS VULGARIS
 PATIENT, AND THERAPEUTIC MEDICINE,
 THERAPEUTIC INSTRUMENT, DIAGNOSTIC
 MEDICINE AND DIAGNOSIS FOR PEMPHIGUS
 VULGARIS**

presence or absence of the expressron after transduced
 in the cell can easily be examined, and the purification
 of the fused protein after the expression is facilitated.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a fused protein capable of being recognized with an autoantibody of a pemphigus vulgaris patient by ligating the hinge part of the constant region of IgG to the C-terminal of the extracellular region of a pemphigus vulgaris antigen protein.

CONSTITUTION: A fused protein is produced by ligating the hinge part of the constant region of IgG to the C-terminal of a protein which is represented by the sequence of the formula and which is the extracellular region (PVAg) of a pemphigus vulgaris antigen protein. When a gene coding the fused protein is transduced into an animal cell or an insect cell to express the fused protein, the expressed fused protein can accurately be discharged from the cell, because of using the amino acid sequence of the PVAg. Since the hinge part of the constant region of the IgG is ligated, the fused protein can stably be produced, and the high-dimensional structure of the PVAg is the same as that of the natural PVAg. Since the IgG is ligated to the cut part of the C-terminal side, the autoantibody can surely be recognized. Further, since the IgG is contained, the

Met	Gly	Leu	Phe	Pro	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ile	Phe	Val
1				5				10					15	
Val	Val	Ile	Leu	Val	His	Gly	Glu	Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Gly
				20				25					30	
Cys	Gln	Cys	Asp	Asn	Arg	Gly	Ile	Cys	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Thr
				680				685					690	
Thr	Ser	Pro	Gly	Thr	Arg	Tyr	Gly	Arg	Pro	His	Ser	Gly	Arg	
				695				700					704	

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-188540

(43) 公開日 平成8年(1996)7月23日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/00	ABC H			
	ADA			
39/385				
49/00	A			
		9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求	未請求	請求項の数 6 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-165632	(71) 出願人	593203479 西川 武二 神奈川県横浜市保土ヶ谷区峰岡町2-217-8
(22) 出願日	平成7年(1995)6月30日	(72) 発明者	天谷 雅行 東京都千代田区六番町6-1-504
(31) 優先権主張番号	特願平6-173291	(72) 発明者	橋本 隆 東京都新宿区富久町9-11-1102
(32) 優先日	平6(1994)6月30日	(72) 発明者	清水 信義 千葉県佐倉市ユウカリが丘4-1 W2103
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 足立 勉 (外2名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質、並びに尋常性天疱瘡の治療薬、治療器具、診断剤及び診断方法

(57) 【要約】

【目的】 尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質を提供すると共に、副作用の影響の少ない尋常性天疱瘡の治療薬や治療器具を提供すること、更に尋常性天疱瘡の有効な診断剤及び診断方法を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の融合蛋白質は、尋常性天疱瘡抗原蛋白質の細胞外領域 (PVAg) のC末端に、IgGの定常領域がヒンジ部を介して結合されている。本発明ではPVAgを用いたため、該融合蛋白質をコードする遺伝子を動物細胞等に導入し該融合蛋白質を発現させた際、発現された融合蛋白質は細胞外に確実に排出される。また、IgGの定常領域のヒンジ部と結合したため該融合蛋白質を安定に生産すると共にPVAgの高次構造が天然のものと同等になり、C末端側の切断部分にIgGを結合したため確実に自己抗体に認識される。更に、IgGを存在させたため、細胞導入後の発現の有無を容易に検査でき、発現後の融合蛋白質の精製が容易になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質であって、

尋常性天疱瘡抗原蛋白質の細胞外領域である配列番号1に表される蛋白質のC末端に、IgGの定常領域がヒンジ部を介して結合されたことを特徴とする融合蛋白質。

【請求項2】 尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質であって、

尋常性天疱瘡抗原蛋白質の細胞外領域である配列番号1に表される蛋白質のC末端に、タグ抗原が結合されたことを特徴とする融合蛋白質。

【請求項3】 請求項1又は2記載の融合蛋白質を有効成分として含有する尋常性天疱瘡の治療薬。

【請求項4】 請求項1又は2記載の融合蛋白質を担体に固定した吸着剤を有することを特徴とする尋常性天疱瘡の治療器具。

【請求項5】 請求項1又は2記載の融合蛋白質を免疫診断の抗原として用いることを特徴とする尋常性天疱瘡の診断剤。

【請求項6】 請求項2記載の融合蛋白質を結合させた不溶性担体に患者血清を加えることにより前記融合蛋白質と前記患者血清中の尋常性天疱瘡患者自己抗体とを結合させ、次いで前記尋常性天疱瘡患者自己抗体に特異的に結合する標識抗体を反応させ、該反応物の標識量を測定する尋常性天疱瘡の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質、並びに、尋常性天疱瘡の治療薬、治療器具、診断剤及び診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 尋常性天疱瘡（以下、P Vという）は皮膚、粘膜に水疱を生じ、ときには致死的に至る水疱性自己免疫疾患である。臨床的には、P Vの初期の水疱は弛緩性水疱で、その疱膜は容易に破れ、大きなびらん面を呈するようになる。びらん面は滲出性で出血しやすい。重篤な例では、びらん面からの体液喪失、2次感染を伴い、致死になることがある。P V患者の健常部を指でこすると、表皮上層部がずれ落ちる、いわゆるニコルスキー現象がみられる。病変部の病理組織像では表皮細胞の細胞間結合が矢われ、遊離した表皮細胞が認められる。

【0003】 また病変部皮膚を、蛍光抗体法で調べてみると、表皮細胞膜表面にIgGの沈着が認められる。さらにP V患者血中には、表皮細胞膜表面に結合するIgGが検出される。この患者血中のIgGを新生マウスに注射すると、マウス皮膚にP Vに特徴的な組織像を持つ水疱が誘導される。またP V患者IgGを培養液に入れた状態で皮膚を器官培養すると、その皮膚にP Vと同様の表皮融解が認められることなどから、P V患者に認められるIg

Gは、水疱形成において病因的な役割を担っていると考えられていた。

【0004】 天谷らは、正常ヒト培養表皮細胞より作製されたcDNA発現ライブラリーを、P V患者血清よりアフィニティー精製された抗130kD天疱瘡抗原蛋白質認識IgGを用いて免疫スクリーニングし、特異的に反応するクローンを得て尋常性天疱瘡抗原蛋白質のcDNA配列を決定した（Cell, 1991年第67巻, 869-77頁）。

【0005】 DNA配列をもとに得られたアミノ酸からなる蛋白質は、重層扁平上皮に発現の見られる新しいタイプのカドヘリン分子であることを発見した。同様に別のタイプの抗表皮細胞膜抗体を持つ自己免疫性水疱症疾患である落葉状天疱瘡、ブラジル落葉状天疱瘡のcDNA配列も決定された（European Journal of Cell Biology 1990年第53巻, 10-12頁, Amagaya et al.）。

【0006】 このようにP V患者では、上皮中にある細胞接着因子カドヘリンの1種である尋常性天疱瘡抗原蛋白質に対する自己抗体が産生される。その抗体が尋常性天疱瘡抗原蛋白質と反応することにより、接着因子としての尋常性天疱瘡抗原蛋白質の機能を阻害し、2次的にプラスミン、補体などを活性化し、表皮の遊離に至ると考えられた（Journal of Investigative Dermatology 1995年第104巻, 146-152頁, Amagaya）。

【0007】 現在P V患者に対する治療の試みは、ステロイドや免疫抑制剤による一次的な症状の軽減を期待する対症療法のみであり、副作用も強く、根本的なものはなく、疾患の病態を考慮した上での特異的な治療法は存在しない。一方、天疱瘡の診断は、専門医による臨床的所見、病変部の病理組織学的所見、及び患者血清を用い、正常表皮切片を基質とした蛍光抗体法による免疫組織学的所見に基づき、なされている。これらの診断法は簡便性、客観性に欠ける。

【0008】 最近、尋常性天疱瘡抗原蛋白質を大腸菌の発現系を用い遺伝子組換えにより人工的に合成し、この蛋白質を用いた抗原型診断薬の試みがなされているが、陽性率は約5～6割と低く（Journal of Clinical Investigation 1992年第90巻, 919-926頁, Amagaya et al.）、実用的ではない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 上述したように現在の免疫抑制剤による治療は、すべての免疫反応を一様に抑制するものであり、副作用も強く、その効果も一次的であるという問題があった。

【0010】 従って本発明は、従来の全ての免疫反応を一様に抑制するという問題点を鑑みてなされたものであって、尋常性天疱瘡に関係する免疫反応のみを選択的に抑制するものである。すなわち、原因物質である尋常性天疱瘡自己抗体の除去あるいは、自己抗体産生細胞の破壊をおこなうものである。

【0011】 また、従来有効な診断法がない尋常性天疱

瘡は、特異性、感度に優れ、早期の診断に役立ち、かつ病勢と相関する実用的な診断薬の開発が課題とされていた。よって本発明は、尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質を提供すると共に、副作用の影響の少ない尋常性天疱瘡の治療薬や治療器具を提供すること、更に尋常性天疱瘡の有効な診断剤及び診断方法を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段、作用及び発明の効果】上記課題に鑑み鋭意検討を行った結果、本発明者らは以下の発明を完成させた。請求項1の融合蛋白質は、尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質であって、尋常性天疱瘡抗原蛋白質の細胞外領域である配列番号1に表される蛋白質のC末端に、IgGの定常領域がヒンジ部を介して結合されたものである。

【0013】尋常性天疱瘡抗原蛋白質は膜貫通蛋白質であり、自己抗体はin vivoの状態では細胞膜を通過できないため、本発明者らは自己抗体の認識する領域を細胞外領域と考え、この細胞外領域（配列番号1）のみをコードする遺伝子を調製した（以下、特にことわりのない限り細胞外領域を単にPVAgと呼ぶ）。このように細胞外領域であるPVAgのアミノ酸配列を用いたため、請求項1の融合蛋白質をコードする遺伝子を動物細胞または昆虫細胞に導入して該融合蛋白質を発現させた際、発現された融合蛋白質が細胞内に閉じ込められることなく細胞外に確実に排出されるという作用効果を奏する。また、請求項1の融合蛋白質ではPVAgにIgGの定常領域のヒンジ部を結合したため、該融合蛋白質を安定に生産すると共にPVAgの高次構造が天然のものと同等になるという作用効果を奏する。更に、請求項1の融合蛋白質ではC末端側の切断部分にIgGを結合したため、もとの蛋白質（尋常性天疱瘡抗原蛋白質）のN末端からはじまりC末端に向かう途中で切断されている細胞外領域は、より確実に自己抗体に認識されるという作用効果を奏する。更にまた、請求項1の融合蛋白質にIgGを存在させたため、細胞導入後の発現の有無を市販の抗IgG抗体を用いることにより容易に検出が可能となり、また、発現後の融合蛋白質の精製においてIgGと親和性のあるプロテインAをリガンドとして持つセファロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより容易に精製が行えるという作用効果を奏する。尚、請求項1の融合蛋白質の原料となるIgGは種類、動物種により限定されるものではない。

【0014】請求項2の融合蛋白質は、尋常性天疱瘡患者自己抗体に認識される融合蛋白質であって、尋常性天疱瘡抗原蛋白質の細胞外領域である配列番号1に表される蛋白質のC末端に、タグ抗原が結合されたものである。ここにおいてタグ抗原とは、目的とされる蛋白質（ここではPVAg）との融合蛋白質として発現され、既に特異性の明らかになっているモノクローナル抗体によって認識される抗原部位（エピトープ）をいい、目的とす

る蛋白質を遺伝子工学的に産生する場合に、その精製、局在解析を容易にする目的で使われる。例えば、所定数のヒスチジンをつなげたもの（例えば6つのヒスチジンをつなげたものは「His tag」という）、Etag、 β -ガラクトシダーゼ、A蛋白質、Z領域、G蛋白質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ポリアルギニン、ポリグルタミン、Sペプチド、Tac抗原、グリーンフルオレッセントプロテイン、HA、c-myc等が挙げられる（雑誌「実験医学」Vol. 13, No. 4, p85-90(1995)）。

請求項2の融合蛋白質において、細胞外領域であるPVAgのアミノ酸配列を用いたことによる作用効果、C末端側の切断部分にタグ抗原を結合したことによる作用効果は、請求項1と同様である。更にまた、請求項2の融合蛋白質にタグ抗原を存在させたため、発現後の融合蛋白質の精製が容易化されるという作用効果を奏する。例えば、タグ抗原としてヒスチジンをつなげた場合にはヒスチジンと親和性のある金属イオンをリガンドとして持つセファロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより容易に精製が行える。また、Etagをつなげた場合には抗Etag抗体を用いることによって目的とする蛋白質（PVAg）の産生を検出することができる。

【0015】請求項1、2の融合蛋白質（以下、本発明の融合蛋白質という）を製造する方法としては、例えば、本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子を動物細胞または昆虫細胞に導入して該融合蛋白質を発現させ、培養上清を回収した後、適当なカラムクロマトグラフィーにより精製する方法が挙げられる。この場合、従来の大腸菌を宿主とした発現系と異なり、COS7細胞のような動物細胞、あるいはバキュロウイルスをベクターとして利用し昆虫細胞を宿主とした発現系を用いることが好ましい。

【0016】請求項3の尋常性天疱瘡の治療薬は本発明の融合蛋白質を有効成分として含有するものである。例えば、本発明の融合蛋白質とコレラトキシン、マイトマイシンC等の毒素とを共有結合などで結合した結合体を尋常性天疱瘡患者に投与することにより自己抗体産生細胞の選択的破壊を行うことができるため、該結合体を尋常性天疱瘡の治療薬として用いることができる。この際、マウスを用いた急性毒性実験の結果は、融合蛋白質1000mg/kgを腹腔に注射した投与群で50%の致死毒性が発現したが、それ以下の投与量では2週間後でも影響はみられなかった。この融合蛋白質は本来、生体に存在する組織結合蛋白質であり、毒性は極めて低い。このLD₅₀値は、成人一人当たりの治療における最大投与量の約100000倍量であり問題とならない。また、本発明の融合蛋白質に毒素、例えばコレラトキシン、マイトマイシンCなどを結合したものでLD₅₀は10mg/kgであるが、この値も成人一日当たりの治療における最大投与量の約100倍量であり問題とならない。かかる尋常性天疱瘡の治療薬の成人一日当たりの投与量は投与方法および病

状によっても異なるが、通常の投与量は本発明の融合蛋白質の量で 3×10^{-9} Mないし 3×10^{-10} M程度であり、投与経路は主として静脈注射または筋肉注射が好ましい。また、具体的な製剤例として、生理食塩水またはクエン酸緩衝液中に 3×10^{-9} Mないし 3×10^{-10} M含むものを挙げることができる。また、これに加えてその他の任意成分として、医薬上許容可能な安定剤、崩壊剤、溶解補助剤なども適宜添加し得る。

【0017】請求項4の尋常性天疱瘡の治療器具は、本発明の融合蛋白質を担体に固定した吸着剤を有するものである。例えば、本発明の融合蛋白質を水不溶性の担体に固定化して、尋常性天疱瘡患者IgGを選択的に吸着する抗原とし、血漿交換による天疱瘡自己抗体の選択的除去を行うことにより、尋常性天疱瘡の治療に用いることができる。使用される担体としては、アガロース系、セルロース系、ポリアクリルアミド系、ポリスチレン系、アクリル酸エステル系、等の有機高分子、コラーゲン、キトサン等の生体由来の天然有機高分子あるいは活性炭素、セラミック等の無機物が挙げられ、その形態として平板状、粒子状等様々な形態を使用し得るが、表面積を大きく採れるものが好ましい。PVAg-IgG融合蛋白質と担体との固定化は共有結合によって行われる。例えば、担体はその表面に有するエポキシ基やアルデヒド基等の反応性官能基に水性溶液中で直接結合することによって実施される。また、アミノ基等の官能基を表面に有する担体を用いる場合は、PVAg-IgG融合蛋白質と担体との混合水性溶液にジアルデヒドやジエポキシ化合物等の反応性多官能基を有する化合物をを添加し、反応させることによって実施することができる。

【0018】請求項5の尋常性天疱瘡の診断剤は、本発明の融合蛋白質を免疫診断の抗原として用いるものである。例えば、本発明の融合蛋白質は、ウェスタンブロット法、RIA法、EIA法などの免疫診断方法の抗原蛋白質として用いられ、患者血液中の自己抗体の測定を行うことができる。これにより、従来有効な診断剤がなかった尋常性天疱瘡において、特異性、感度に優れ、早期の診断に役立つ診断剤を提供することができる。

【0019】請求項6の尋常性天疱瘡の診断方法は、請求項2の融合蛋白質を結合させた不溶性担体に患者血清を加えることによりこの融合蛋白質と前記患者血清中の尋常性天疱瘡患者自己抗体とを結合させ、次いで前記尋常性天疱瘡患者自己抗体に特異的に結合する標識抗体を反応させ、該反応物の標識量を測定する方法である。ここで、標識抗体における標識物質としては、例えばペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ビオチン等の各種酵素やアイソトープの標識抗体が挙げられる。本診断方法によれば、従来のように正常表皮切片を基質とする必要がないため簡便性、客観性に優れるという効果が得られ、また、特異性及び感度に優れるため尋常性天

疱瘡の早期発見に役立つという効果も得られる。尚、請求項2の蛋白質に代えて請求項1の融合蛋白質を用いた場合、尋常性天疱瘡患者自己抗体に特異的に結合する標識抗体は請求項1の融合蛋白質のIgG領域にも結合してしまうため、上記自己抗体の定量性が失われ、的確に診断できないという問題がある。

【0020】

【実施例】以下、本発明の好適な実施例について詳細に説明する。尚、本発明は下記の実施例に何ら限定されるものではなく、本発明の技術的範囲に属する限り、種々の態様で実施できることはいうまでもない。

【実施例1】PVAgにIgGが結合された融合蛋白質(PVAg-IgG)

【1-1】動物細胞COS7細胞によるPVAg-IgGの発現
PVAg-IgG蛋白質発現領域(シグナルペプチド領域-プロシークエンシス領域-細胞外蛋白領域(配列番号1)-ヒトIgG ヒンジ部-ヒトIgG CH2部-ヒトIgG CH3部)を含むpcDNA1-PVAg-IgG発現プラスミドDNAを作製した(尚、pcDNA1はインビトロゲン(Invitrogen)社の商品名である)。以下にpcDNA1-PVAg-IgG発現プラスミドDNAの作製法を説明する。

【0021】基本的に、必要なcDNAは増幅されるcDNAの両側の配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法によって増幅した。オリゴヌクレオチドは制限酵素の切断位置もしくは付加されるペプチドのコーディング領域を作り出すようにデザインされた。PCRは、94℃1分、55℃2分、72℃3分を20乃至25サイクル繰り返した。

【0022】COS7細胞用の発現ベクターを構築するために、まず、PVAgをコードするcDNAを、PVAgとマウスEカドヘリンの細胞質領域からなるキメラ蛋白質を含む哺乳動物の発現ベクターであるpcDNA1-PVCEIII(Journal of Investigative Dermatology1994年第102巻, 402-408頁, Amagaya et al.)上でPCR増幅した。5'プライマーとしてはベクター配列中のT7プライマーを用い、3'プライマーとしては以下の配列を用いた。

【0023】5'-CCTGCTCGAGCCCTCCCTGAGTGC GGCCCT-3'(PVAgのEC5領域の末端のすぐ上流にあるアンチセンス配列及びXhoI切断部位を含む)

このPCR産物は5'非コード領域及びシグナルペプチド、プロシークエンシス及びPVAg(ヌクレオチド1-1929)をカバーするコード領域を持っていた。

【0024】一方、ヒトIgG1の定常領域をコードするcDNAは、pTJ5(Journal of Biotechnology 1988年第8巻, 141-148頁, Nakamura et al.)上でPCR増幅によってつくられた。プライマーとしては以下の配列のものを用いた。

5'プライマー: 5'-CCTGCTCGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCA-3'(全ヒンジ領域及びXhoIサイトを含む)

3' プライマー: 5'-CCATCTAGATCATTTACCCGGGACAG-3' (ストップコドン直上のアンチセンス配列及びXhoIサイトをコードする)

以上のようにして得られたPVAgのPCR産物及びIgG1のPCR産物はNotI-XhoI及びXhoI-XbaIでそれぞれ消化し、NotI-XbaIでカットしたサイトメガロウイルス (CMV) プロモータを有する真核生物の発現ベクターであるpcDNA1/Amp (インビトロゲン社製) と結合させた。これをpcDNA1-PVAg-IgGと命名した。

【0025】このpcDNA1-PVAg-IgG発現プラスミドDNAを、リポソーム (商品名: リポフェクチン、ギブコ社製) を使用して一時的にCOS7細胞へトランスフェクションした。すなわち、直径100mmの大きさのCOS7細胞を培養したプレートに、10 μ gの発現プラスミドDNAと、血清を含まないDMEM5mlとリポフェクチン50 μ lの混合液を入れてトランスフェクションを行い、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベーションした後に牛胎児血清を20%含むDMEMを5ml加え、一昼夜インキュベーションを行った。

【0026】翌日、その培養上清を除き、血清を含まないDMEM 6mlで置き換えた。インキュベーションは37 $^{\circ}$ Cで3日間続け、培養上清を採取し、血清を含まないDMEM 6mlに置き換えた。更に37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベーションし、上清を採取して細胞を捨てた。

【0027】採取した上清は遠心分離して非付着性細胞や残骸を除き、2回分を一ケ所に集めて使用時まで-70 $^{\circ}$ Cで保存した。平均して上清中には約0.1~0.5 μ g/mlのPVAg-IgG蛋白質が含まれていることが、蛋白質測定キット (プロテインアッセイキット、BioRad社製) による測定でわかった。

【0028】図3は、PVAg-IgGの分子構造を表す説明図である。PVAg-IgGは、シグナルペプチド(S)、プロシーケンス(P)、PVAg (EC1~EC5)、及びヒトIgG1の定常領域 (ヒンジ(H)、CH2、CH3領域を含む) を含む。図1の下段には融合位置周辺のアミノ酸配列が示されているが、新たな制限酵素位置を構築するために一つのロイシンが導入された。

【1-2】昆虫細胞Sf9によるPVAg-IgGの発現
pcDNA-PVAg-IgGと同様にPVAg-IgG蛋白質発現領域を含むプラスミドであるpEVmod-PVAg-IgGのDNA (尚、pEVmodはPharmlingen社の商品名である) と、バキュロウイルスであるバキュロゴールド (Pharmlingen社製) のDNAの両者をSf9昆虫細胞にコトランスフェクションすることにより、組換え型のPVAg-IgG-Sf9を生成する組み換えバキュロウイルスを得た。

【0029】すなわち、常法により、約3 \times 10⁶個のSf9細胞を直径60mmの大きさの培養用ディッシュに10%牛胎児血清を含むGrace's昆虫細胞用培地10mlとともに入れ、細胞が付着するように27 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベーションを行った。その間に、pEVmod-PVAg-IgGのDNA2 μ g、バキュロゴールドDNA 0.5 μ g、DNA導入用リポソーム

(商品名: リポフェクチン、ギブコ社製) 30 μ lを、血清を含まないGrace's昆虫細胞用培地 1.5mlに溶かし、室温で15分間インキュベーションしてDNA-リポソーム混合物を調製した。

【0030】培養ディッシュ上でインキュベーションを行ったSf9細胞に先に調製したDNA-リポソーム混合物を含み血清を含まないGrace's培地を徐々に1.5ml加え、トランスフェクションした細胞を27 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞は血清を含まないGrace's培地で一度洗い、10%の牛胎児血清を含むGrace's培地に置き換えて27 $^{\circ}$ Cで4日間インキュベーションした。

【0031】その後、培養上清を採取し直径100mmのディッシュのセミコンフルエント状態のSf9細胞に感染させ、3~5日間インキュベーションした。この操作を3回繰り返し、高力価のPVAg-IgG-Sf9を生成するバキュロウイルスを含む上清を得た。高力価の組換え型バキュロウイルスで感染したSf9細胞を5日間培養した上清は、遠心分離して細胞残骸を除いた後、-70 $^{\circ}$ Cで保存した。平均して、上清中には約5~10 μ g/mlのPVAg-IgG蛋白質が含まれていることが蛋白質測定キット (プロテインアッセイキット、バイオラッド社製) での定量によりわかった。

【1-3】PVAg-IgG融合蛋白質の精製濃縮
PVAg-IgG融合蛋白質の精製濃縮するため、常法通り、プロテインAセファロース (ファルマシア社製) 50 μ lをCOS7またはSf9細胞の上清5mlに加え、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜インキュベーションし、PBSで2度洗いした後、2 \times SDSサンプル緩衝液 (125mM Tris-HCl pH7.5, 2%SDS, 0.005% bromophenol blue, 20% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) 50-100 μ lで再懸濁した。

【1-4】PVAg-IgG融合蛋白質の発現の確認
濃縮されたPVAg-IgG融合蛋白質はSDS-PAGEで分離され、PVDF膜 (ミリポア社製、商品名: Immobilon) に転写された。PVAg-IgG融合蛋白質を検出するため、3%スキムミルク溶液でブロッキングを行い、PVDF膜はアルカリホスファターゼと結合したヤギの抗ヒトIgG抗体 (Zymed Laboratories Inc. 製) の1000倍希釈溶液と、室温で1時間インキュベーションした。その後アルカリホスファターゼ発色キット (BioRad社) により一本のバンドとして検出され、その分子量は約110kDであった。

【1-5】イムノブロット解析
患者または健康人の血清中PVAg抗体とCOS7細胞またはSf9細胞によって得られたPVAg-IgGの反応性を見るため、PVAg-IgGを転写したPVDF膜は、まずヒト血清の50倍希釈溶液とインキュベーションし、次にマウスの抗ヒトIgG4抗体 (Oxoid社製) の30倍希釈溶液、アルカリホスファターゼと結合したヤギの抗マウス抗体 (Zymed Laboratories Inc. 社製) の1000倍希釈溶液とインキュベーションし、その発色を調べた。用いた血液は、35人の尋常性

10

20

30

40

50

天疱瘡患者（P V）、10人の落葉状天疱瘡患者（P F）、16人のブラジル落葉状天疱瘡患者（B P F）、10人の水疱性類天疱瘡患者（B P）、5人の健常人血清（N）である。35人の尋常性天疱瘡患者の血清は全てC0 S7細胞で生成したPVAg-IgGと反応は陽性であったが、36人の水疱症患者対照群、または5人の健常人からは全く反応が認められなかった（図1）。

【0032】Sf9細胞で生成したPVAg-IgGもまた、35人の天疱瘡の患者血清は全て反応は陽性であったが、36人の水疱症患者対照群、または5人の健常人からは、全く反応が認められなかった（図2）。

【1-6】新生児マウスを用いたPVAgによる自己抗体吸収実験

次に新生児マウスを用いたPVAgによる自己抗体吸収実験を行った。天疱瘡患者血清10mlに、PVAg-IgG組換えバキュロウイルスを感染させたSf9細胞の上清50mlと室温で4時間インキュベーションし、4℃、13000×gで30分間遠心分離して沈澱を除いた。その後、IgG画分は40%硫酸アンモニウムで沈澱させ、PBS-Ca溶液で透析して小型濃縮器Centricon100（アミコン社製）で1ml（元の容量の1/10）まで濃縮した。これらの濃縮されたIgGs（マウス1匹当たり100-150μl）は文献（N. Engl. J. Med., 1982年第306巻 1189-1196頁、J. Clin. Invest., 1992年第90巻919-926頁）を参考にして新生児BALB/cマウス（生誕24時間以内）に皮下注射した。新生児マウスは注射後18～24時間の間、生検を実施した。

【0033】コントロール実験として、上記の実験系においてPVAg-IgG組換えバキュロウイルスを感染させたSf9細胞にかえてバキュロウイルスを感染させていないSf9細胞の上清50mlを加えた系では、新生児マウスに広範囲の水疱、びらんが観察されたがPVAg-IgG組換えバキュロウイルスを感染させたSf9細胞の上清をインキュベーションした系においては、水疱の形成は肉眼的にも、病理組織学的にも認められず水疱症を誘発する病原活性は失われたことが明らかになった。

【1-7】尋常性天疱瘡の治療器

上記知見に基づき天疱瘡の治療器を作製した。液体流入口および排出口を上下端にそれぞれ設けた筒状のポリカーボネート製ハウジング内に、表面にPVAg-IgGを介して共有結合せしめた球状担体（商品名：E A H Sepharose 4 B、平均粒径45～165μm、Pharmacia社製）を充填し、流入口及び排出口にはそれぞれ150メッシュのポリエステル製フィルターを固定したものを作製した。

【0034】この治療器が有効に機能することを確認するため、天疱瘡患者血清10mlをペリスタルティックポンプを用い、約1ml/minの流速で注入した。排出口より流出する血清を集め、イムノブロット解析を行い、自己抗体の存在を調べたが、その存在は全く確認できず、この治療器が天疱瘡患者自己抗体を有効に吸収することが明らかになった。

【0035】従って、この治療器によれば、従来の免疫抑制剤を使用した場合には全ての免疫反応が抑制されるため副作用が強かったのに対して、尋常性天疱瘡に関係する免疫反応のみが選択的に抑制されるため副作用が軽減されるという効果が得られる。

【実施例2】PVAgにHis tagが結合された融合蛋白質（PVAg-His）

【2-1】PVAg-His発現プラスミドの構築

以下のようにXhoI切断部位及びE tagをコードするプライマーと、His tag及びKpnI切断部位をコードするプライマーを調製し、PCR法によりE tag及びHis tagをコードするcDNAの構築を行った。

【0036】

【XhoI切断部位及びE tag をコードするプライマー】

5' プライマー(DN516)GCCCTCGAGGGTGC GCCGTGCGTATA

【His tag及びKpnI切断部位をコードするプライマー】

3' プライマー(DN517)CGGGGTACCTCAATGATGATGATGGCC

PCRは94℃で1分処理した後94℃1分、55℃1分、72℃1分を20サイクル繰り返し、72℃7分処理して、クロロホルムを加えた後エタノールを加えてPCR産物を沈殿した。これらのPCR産物は制限酵素XhoI及びKpnIで37℃2時間処理後、ゲル内電気泳動により目的とするHis tag及びE tagをコードするDNAを採取し、QIAEX kit（キアゲン社製）でDNAを精製した。精製したDNAは制限酵素XhoI及びKpnIで消化し、IgGをコードする領域を除いたpEVmod-PVAg-IgGと結合させることにより、PVAg-His発現プラスミドpEVmod-PVAg-Hisを作製した。このpEVmod-PVAg-Hisは配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む。

【2-2】昆虫細胞Sf9によるPVAg-Hisの発現

pEVmod-PVAg-Hisとバキュロゴールド（ファーマーミンゲン社）のDNAの両者を、上記【1-2】と同様にしてSf9細胞にコトランスフェクトすることにより、組換え型のPVAg-His-Sf9を生成するバキュロウイルスを含む上清を得た。

【2-3】PVAg-His融合蛋白質の精製濃縮

PVAg-His融合蛋白質を精製濃縮するため、1mlのNi²⁺-NTA-アガロース（キアゲン社製）に0.22μmのフィルターでろ過した上記培養上清を添加し、8mlの結合バッファー（20mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH7.8）で洗浄した後さらに洗浄バッファー（20mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH6.3）で2回洗浄した。次いで溶出バッファー（200mMイミダゾールを含む洗浄バッファー）0.6mlで溶出しさらに溶出バッファー1.2mlで2回溶出した。

【0037】イムノブロットングによりPVAg-Hisを含む分画を確認し、Ca加生理的トリス塩酸緩衝液（TBS）で十分透析し、4℃で保存した。尚、PVAg-Hisの分子構造は、シグナルペプチド(S)、プロシーケンス(P)、PVAg (EC1～EC5)、及びPVAgのEC5に結合した6つのヒス

チジンを含む。

〔2-4〕ELISA法によるPV診断

尋常性天疱瘡患者であるか否かの診断は以下のよう
に行うことができる。

【0038】96穴平底マイクロタイタープレート（タイターテック社製）の各ウェルに50μlのPVAg-His溶液を加え、4℃で一晩インキュベイトした後、PVAg-His溶液を除き、1%BSA, 0.005% tween20を含むCa加DTBS（ブロッキングバッファー）200μlを加え、室温で1時間ブロッキングし、0.005% Tween20を含むCa加DTBS（洗浄バッファー）で洗浄する。これにブロッキングバッファーで10倍希釈した患者血清50μlを加え室温で1時間反応させる。洗浄バッファーで4回洗浄し、50μlのペルオキシダーゼ標識抗体を加え室温で1時間反応させ、再度洗浄した後100μlの発色基質（オルトフェニレンジアミン4mg、31%過酸化水素6μlを含む0.1Mクエン酸/0.2Mリン酸2ナトリウム溶液（pH4.8-5.0））を加え、室温で30分反応させ発色させた後、50μlの4N硫酸を加えて反応を停止し、波長492nmの吸光度を測定する。この際、尋常性天疱瘡患者50例の血清を測定し、その平均値に相当する患者血清を集めて標準血清とし、この標準血清と患者血清につき測定を行い、以下の式から患者血清のインデックス値を求める。

【0039】

【数1】

$$\text{インデックス値} = \frac{\text{患者血清の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}}{\text{標準血清の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}}$$

配列

Met	Gly	Leu	Phe	Pro	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ile	Phe	Val
1				5					10					15
Val	Val	Ile	Leu	Val	His	Gly	Glu	Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Gly
				20					25					30
Gln	Tyr	Asp	Glu	Glu	Met	Thr	Met	Gln	Gln	Ala	Lys	Arg	Arg	
				35					40					45
Gln	Lys	Arg	Glu	Trp	Val	Lys	Phe	Ala	Lys	Pro	Cys	Arg	Glu	Gly
				50					55					60
Glu	Asp	Asn	Ser	Lys	Arg	Asn	Pro	Ile	Ala	Lys	Ile	Thr	Ser	Asp
				65					70					75
Tyr	Gln	Ala	Thr	Gln	Lys	Ile	Thr	Tyr	Arg	Ile	Ser	Gly	Val	Gly
				80					85					90
Ile	Asp	Gln	Pro	Pro	Phe	Gly	Ile	Phe	Val	Val	Asp	Lys	Asn	Thr
				95					100					105
Gly	Asp	Ile	Asn	Ile	Thr	Ala	Ile	Val	Asp	Arg	Glu	Glu	Thr	Pro
				110					115					120
Ser	Phe	Leu	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Leu	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Asp
				125					130					135
Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Ile	Leu	Thr	Val	Lys	Ile	Leu	Asp	Ile	Asn
				140					145					150
Asp	Asn	Pro	Pro	Val	Phe	Ser	Gln	Glu	Ile	Phe	Met	Gly	Glu	Ile

*【0040】別に正常人の血清200例を測定し、そのインデックス値の平均値+3×標準偏差を正常範囲として、これを越えた場合PV抗体を持っていると判断する。かかる診断法によれば、従来のように正常表皮切片を基質とする必要がないため簡便性、客観性に優れるという効果が得られ、また、特異性及び感度に優れるため尋常性天疱瘡の早期発見に役立つという効果も得られる。

10 【0041】また、PV抗体の濃度を測定する方法としては、高力価の患者血清を標準品として倍々希釈により検量線を作製し、診断対象となる患者血清中のPV抗体の濃度を求めることもできる。このようにしてPV抗体の濃度を測定することにより治療効果の判定、患者の臨床症状の推移を追うことができるという効果が得られる。

20 【0042】尚、PVAg-IgGを含む溶液を抗原溶液に用いると、ペルオキシダーゼ標識抗体はPV抗体に結合するばかりでなく、PVAg-IgGのIgG部位にも結合してしまうため、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いて上記ELISA法により診断することはできない。

【0043】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：704

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

155	160	165
Glu Glu Asn Ser Ala Ser Asn Ser Leu Val Met Ile Leu Asn Ala		
170	175	180
Thr Asp Ala Asp Glu Pro Asn His Leu Asn Ser Lys Ile Ala Phe		
185	190	195
Lys Ile Val Ser Gln Glu Pro Ala Gly Thr Pro Met Phe Leu Leu		
200	205	300
Ser Arg Asn Thr Gly Glu Val Arg Thr Leu Thr Asn Ser Leu Asp		
305	310	315
Arg Glu Gln Ala Ser Ser Tyr Arg Leu Val Val Ser Gly Ala Asp		
320	325	330
Lys Asp Gly Glu Gly Leu Ser Thr Gln Cys Glu Cys Asn Ile Lys		
335	340	345
Val Lys Asp Tyr Asn Asp Asn Phe Pro Met Phe Arg Asp Ser Gln		
350	355	360
Tyr Ser Ala Arg Ile Glu Glu Asn Ile Leu Ser Ser Glu Leu Leu		
365	370	375
Arg Phe Gln Val Thr Asp Leu Asp Glu Glu Tyr Thr Asp Asn Trp		
380	385	390
Leu Ala Val Tyr Phe Phe Thr Ser Gly Asn Glu Gly Asn Trp Phe		
395	400	405
Glu Ile Gln Thr Asp Pro Arg Thr Asn Glu Gly Ile Leu Lys Val		
410	415	420
Val Lys Ala Leu Asp Tyr Glu Gln Leu Gln Ser Val Lys Leu Ser		
425	430	435
Ile Ala Val Lys Asn Lys Ala Glu Phe His Gln Ser Val Ile Ser		
440	445	450
Arg Tyr Arg Val Gln Ser Thr Pro Val Thr Ile Gln Val Ile Asn		
455	460	465
Val Arg Glu Gly Ile Ala Phe Arg Pro Ala Ser Lys Thr Phe Thr		
470	475	480
Val Gln Lys Gly Ile Ser Ser Lys Lys Leu Val Asp Tyr Ile Leu		
485	490	495
Gly Thr Tyr Gln Ala Ile Asp Glu Asp Thr Asn Lys Ala Ala Ser		
500	505	510
Asn Val Lys Thr Val Met Gly Arg Asn Asp Gly Gly Tyr Leu Met		
515	520	525
Ile Asp Ser Lys Thr Ala Glu Ile Lys Phe Val Lys Asn Met Asn		
530	535	540
Arg Asp Ser Thr Phe Ile Val Asn Lys Thr Ile Thr Ala Glu Val		
545	550	555
Leu Ala Ile Asp Glu Tyr Thr Gly Lys Thr Ser Thr Gly Thr Val		
560	565	570
Tyr Val Arg Val Pro Asp Phe Asn Asp Asn Cys Pro Thr Ala Val		
575	580	585
Leu Glu Lys Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser Pro Ser Val Val Val		
590	595	600
Ser Ala Arg Thr Leu Asn Asn Arg Tyr Thr Gly Pro Tyr Thr Phe		
605	610	615
Ala Leu Glu Asp Glu Pro Val Lys Leu Pro Ala Val Trp Ser Ile		

620 625 630
 Thr Thr Leu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Leu Arg Ala Gln Glu Gln
 635 640 645
 Ile Pro Pro Gly Val Tyr His Ile Ser Leu Val Leu Thr Asp Ser
 650 655 660
 Gln Asn Asn Arg Cys Glu Met Pro Arg Ser Leu Thr Leu Glu Val
 665 670 675
 Cys Gln Cys Asp Asn Arg Gly Ile Cys Gly Thr Ser Tyr Pro Thr
 680 685 690
 Thr Ser Pro Gly Thr Arg Tyr Gly Arg Pro His Ser Gly Arg
 695 700 704

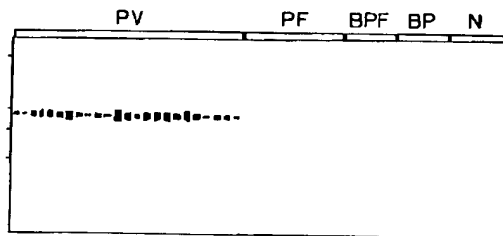
【図面の簡単な説明】

【図1】 動物細胞 (COS7) によって得られたPVAg-IgGと各種血清のイムノプロット解析の結果を表す説明図である。

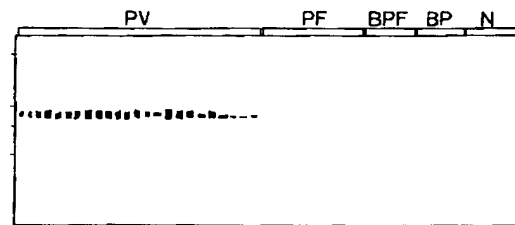
* 【図2】 昆虫細胞 (SF9) によって得られたPVAg-IgGと各種血清のイムノプロット解析の結果を表す説明図である。

* 【図3】 PVAg-IgGの分子構造を表す説明図である。

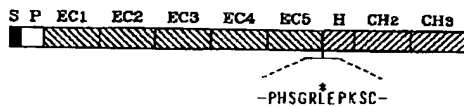
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 14/47

16/28

19/00

8318-4H

G 0 1 N 33/564

Z

// A 6 1 M 1/36

5 4 5

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/02

Z N A C

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 西川 武二

神奈川県横浜市保土ヶ谷区峰岡町2-217

- 8

※ (72) 発明者 浦上 研一

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

※50